

果胶酶产生菌 ZH-g 的原生质体形成与再生研究

朱宏莉¹, 宋纪蓉^{2,*}, 张 嘉¹, 杨彬彬³, 徐抗震², 黄 洁², 杨明琰²

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学化工学院, 陕西 西安 710069;

3. 陕西赛德高科生物股份有限公司, 陕西 西安 710054)

摘 要: 本文通过研究酶浓度、酶的作用时间、菌龄、菌体预处理等不同因素对原生质体形成与再生的影响, 得出了果胶酶产生菌 ZH-g 原生质体制备和再生的最佳条件: 加入 0.6 μg/ml 的氨苄青霉素进行菌体预处理, 选用对数生长期的菌株, 以 1.2 mg/ml 溶菌酶 37 ℃ 保温处理 2 h, 原生质体形成率为 92%, 再生率达 50.7%。

关键词: 果胶酶; 细菌; 原生质体制备; 原生质体再生

Study on Protoplast Formation and Regeneration of Pectinase Producing Bacterial ZH-g

ZHU Hong-li¹, SONG Ji-rong^{2,*}, ZHANG Jia¹, YANG Bin-bin³, XU Kang-zhen², HUANG Jie², YANG Ming-yan²

(1. Institute of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Institute of Chemistry Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China;

3. Shaanxi Sci door Hi-Tech Biology Co. Ltd., Xi'an 710054, China)

Abstract: The optimum conditions for preparation and regeneration of ZH-g protoplast were obtained after studying the effects of different factors on them. Under this circumstance- treating strains in log phase with concentration of 1.2 mg/ml lysozyme for 2 hours, after pretreatment on the cells with 0.6 μg/ml ampicillin, the protoplast formation is up to 92%, and regeneration reaches 50.7%.

Key words: pectinase; bacterial; protoplast formation; protoplast regeneration

中图分类号: O93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)08-0068-04

收稿日期: 2005-09-30

* 通讯作者

基金项目: 陕西省教委基金资助项目(00JK138)

作者简介: 朱宏莉(1971-), 女, 讲师, 博士, 主要从事应用微生物方面的研究。

- 26-28; (3): 1-3.
- [2] 张秀云, 余有本, 唐应芬. 天然防腐剂综述[J]. 饮料工业, 2001, 4(4): 1-5.
- [3] 肖丽平, 李临生, 李利东. 抗菌防腐剂()天然抗菌防腐剂[J]. 日用化学工业, 2002, 32(2): 78-81.
- [4] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 学苑出版社, 1997. 1-4, 1871-1876.
- [5] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海科学技术出版社, 1985. 13-15, 890-897.
- [6] 关于进一步规范保健食品原料管理的通知. 卫生部2002年公布.
- [7] K Vrinda Menon, S R Garg. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese[J]. Food Microbiology, 2001, 18: 647-650.
- [8] Stecchini ML, Sarais I, Giavedoni P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork[J]. Food Protection, 1993, 56(5): 406-409.
- [9] Wilkinson J M, Hipwell M, Ryan T, et al. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 76-81.
- [10] Negi P S, Jayaprakasha G K, Jagan Rao Mohan L, et al. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin[J]. Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 4297-4300.
- [11] 中华人民共和国药典(一部)(附录XD)[M]. 2000.
- [12] 周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 科学技术出版社重庆分社, 1987. 289-314.
- [13] M Valero, M C Salmerón. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth[J]. Food Microbiology, 2003, 85: 73-81.

果胶酶是作用于果胶质的一类酶的总称^[1]。由于其在食品、纺织、造纸、环境保护及饲料加工等领域的广泛应用^[2~4]，市场对果胶酶的需求也日益高涨。而果胶酶研究和生产中的一个关键问题是高产菌株的获得。目前，在菌种选育方面，国内外多以菌体细胞为作用对象，采用各种理化手段进行诱变，而以原生质体作为诱变对象获得果胶酶细菌高产菌株的报道还很少^[5]。

原生质体相对于菌体细胞由于缺乏了细胞壁的保护，因此对于各种诱变剂更为敏感，且更易发生变异。本文通过研究不同因素对果胶酶产生菌原生质体形成与再生的影响，获得了原生质体制备和再生的最佳条件，为下一步的诱变育种提供了条件。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

菌株 ZH-g 为本实验室选育菌株^[6]

1.2 培养基

1.2.1 试管斜面培养基^[6]

1.2.2 完全培养基(CM)(%)^[7]

牛肉膏 1，蛋白胨 1，葡萄糖 0.5，酵母膏 0.5，NaCl 0.5，pH7.0~7.2，固体培养基加 2% 琼脂粉。

1.2.3 再生培养基(DM)^[8]

给 CM 培养基内加入 0.5mol/L 蔗糖，pH7.0~7.2，固体培养基加 2% 琼脂粉，半固体培养基加 0.7% 琼脂粉。

1.2.4 原生质体制备液或原生质体稀释用高渗缓冲液(DF)^[8]

0.5mol/L 蔗糖，0.25mol/L 丁二酸钠，0.001mol/L EDTA，0.02mol/L K_2HPO_4 ，0.11mol/L KH_2PO_4 ，0.01mol/L $MgCl_2$ ，pH7.5。

1.3 原生质体制备与再生^[7~13]

1.3.1 菌体培养

将已活化的 ZH-g 取一环接入装有 CM 培养液的锥形瓶中(60ml/250ml)，35℃ 振荡培养过夜，再按 1% 的接种量接入新鲜的 CM 液中(60ml/250ml)，35℃ 振荡培养 3h，加入终浓度为 0.6μg/ml 的氨苄青霉素，继续培养至所需要的时间。

1.3.2 原生质体形成

取青霉素处理过的菌液离心(4000r/min)15min，用 DF 液洗涤沉淀两次，将菌体悬浮于等体积的 DF 液中，调节菌悬液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml。分别取适量上述菌悬液加入 6 只装有 DF 液的无菌试管(或离心管)中。然后加入浓度为 6mg/ml 的溶菌酶液(其中 1 只管内不加溶菌酶，用

来进行原菌计数)，使其最终作用浓度分别为 0.4、0.8、1.2、1.6、2mg/ml。37℃ 水浴保温作用，隔一定时间摇动，使菌体悬浮，充分酶解并避免原生质体聚积成团。定时取样(0.5、1、1.5、2、2.5、3h)，用相差显微镜观察原生质体形成情况；用活菌计数法求原生质体的制备率及再生率。

1.3.3 原生质体形成率和再生率的计算

原菌计数：将青霉素处理后，溶菌酶处理前的菌体，经无菌水系列稀释于 CM 平板上培养，(采用混合平板法，每稀释度重复三个平板)，计算原菌数(A)。

将溶菌酶处理后的菌体分别经两个过程处理：a：用无菌水稀释，在 CM 平皿上培养计数(采用混合平板法或涂布法，每稀释度重复三个平板)，生长的菌落数为未形成原生质体的抗低渗透压的原菌数(B)；b：用 DM 液系列稀释，采用夹层混合平板法在 DM 平皿上培养，(每稀释度作三个平皿)，35℃ 倒置培养 24~48h，所长出的菌落数为原生质体再生的菌数和从未形成原生质体的原菌数之和(C)。

$$\text{原生体形成率} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

$$\text{原生体再生率} = \frac{C - B}{A - B} \times 100\%$$

2 结果与分析

原生质体的制备从本质上讲是各类溶壁酶对细胞壁的酶解生化过程。而原生质体再生，则是原生质体形成细胞壁，进而在普通培养基上生长繁殖的过程。影响原生质体制备和再生的因素很多，包括菌体预处理、酶浓度、酶的作用时间、菌龄等等。

2.1 青霉素预处理对原生质体形成的影响

表 1 氨苄青霉素对原生质体形成的影响
Table 1 The effect of ampicillin on protoplast formation

组别	制备率(%)				
	1h	1.5h	2h	2.5h	3h
加氨苄青霉素	45	78	93	95	82
不加氨苄青霉素	27	45	51	69	73

溶菌酶浓度：1.2mg/ml。

如表 1 所示，菌体培养时加入适量的氨苄青霉素可促进原生质体的形成。这主要是因为氨苄青霉素能够抑制细胞壁的合成。氨苄青霉素为 β-内酰胺类抗生素，可与转肽酶的活性中心结合，从而抑制肽桥的形成，进一步抑制细菌细胞壁主要成分肽聚糖的交联和网状结构的形成，最终抑制细胞壁合成。所以，加入氨苄青霉素可

增强菌体对溶菌酶的敏感性,有利于原生质体的形成。

2.2 溶菌酶浓度与作用时间对原生质体形成的影响

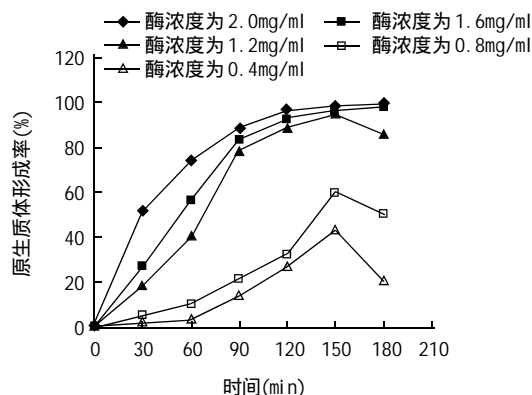


图1 溶菌酶浓度与作用时间对原生质体形成的影响
Fig. 1 The effects of concentration and reaction time of lysozyme on protoplast formation

如图1所示,通过采用不同浓度(0.4~2.0mg/ml)的溶菌酶以不同时间(0.5~3h)处理 ZH-g, 得出2mg/ml 溶菌酶作用3h,原生质体形成率可达99%~100%;1.6mg/ml 溶菌酶作用2.5h,原生质体形成率达97.5%,作用3h达99%;1.2mg/ml 溶菌酶作用2h,原生质体形成率约为90%~92%,作用2.5h,原生质体形成率达95%。从制备原生质体的效果来看,实验的最佳条件是2mg/ml 的酶量,37℃保温3h。但是最佳的原生质体形成条件并非是原生质体再生的最适条件,因为酶量过大、酶解时间过长,首先会严重影响原生质体活性;其次会使细菌脱壁太彻底,从而失去了原生质体再生时合成细胞壁的引物。因而为了兼顾原生质体形成率与再生率,必须选择合适的酶浓度和酶解时间。

2.2.1 酶浓度对原生质体形成率和再生率的影响

适宜的酶浓度是影响原生质体制备的重要因素,酶浓度过大时,酶中往往含有对原生质体有害的酶类(如过氧化物酶、核糖核酸酶等),随着酶量的增加,杂酶的浓度也会随之增加,当达到一定浓度时,必然会影响原生质体的活性;其次,酶浓度过大,一方面易使菌体凝集,难于原生质体化;另一方面会使细胞脱壁太彻底,从而降低原生质体的再生率^[13]。

将摇床培养至对数期的菌液加入不同浓度的溶菌酶作用2h,测定原生质体的形成率和再生率,结果如表2所示。

表2 溶菌酶浓度对原生质体形成率与再生率的影响
Table 2 The effect of concentration of lysozyme on protoplast formation and regeneration

溶菌酶浓度(mg/ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2
原生质体形成率(%)	25	30	92	95.5	98
原生质体再生率(%)	2	9	50.7	38	25

表2清楚地显示了原生质体形成率随酶浓度的增加而提高,但再生率则呈下降趋势。当溶菌酶浓度为1.2mg/ml时,其原生质体形成率达90%~92%,再生率为50.7%,说明此浓度对于ZH-g的原生质体形成及再生较适宜,不但原生质体的形成率高,其再生率也较高。

2.2.2 溶菌酶的作用时间对原生质体形成率和再生率的影响

将摇床培养至对数期的菌液加入1.2mg/ml的溶菌酶,分别作用不同时间后测定其原生质体的形成率和再生率,结果如图2所示。

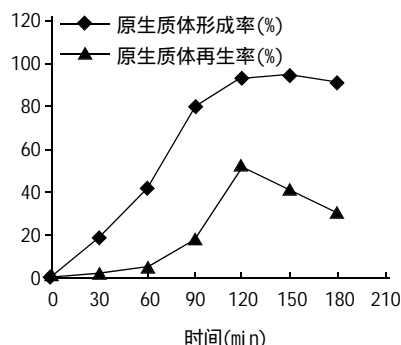


图2 酶作用时间对原生质体形成率和再生率的影响
Fig. 2 The effects of the reaction time of lysozyme on protoplast formation and regeneration

图2表明,ZH-g菌株原生质体形成率随酶解时间的延长而增加,而再生率则呈下降趋势,因此选用2h为酶作用的最佳时间,在此条件下制备的原生质体再生率最高,且形成率也高。

2.3 菌龄对原生质体形成和再生的影响

分别取摇床培养4、8、12、16、20h经青霉素处理过的菌液加入1.2mg/ml的溶菌酶作用2h,测定原生质体的形成率和再生率。

表3 菌龄对原生质体形成率与再生率的影响
Table 3 The effect of different growth phase on protoplast formation and regeneration

菌龄(h)	4	8	12	16	20
原生质体形成率(%)	37	89	71	59	52
原生质体再生率(%)	11	44	35	29	20

如表3所示,菌龄明显影响原生质体的形成和再生。一般而言,处于对数生长期菌体的形成率和再生率均较高,而延迟期一对数前期以及稳定期、衰亡期这些阶段原生质体形成率和再生率明显降低,这主要是因为对数期菌体的生理状态相对一致,代谢旺盛、菌体活性高,对酶的敏感性强,故更易于原生质体化与再生,稳定期的菌体接近老化,胞壁相对变厚,加之芽孢杆菌在此期可形成芽孢,非但难于原生质体化,且

由于菌体本身活性差也难于再生,衰老期的细菌则由于代谢水平低与生活力极低,对酶反应迟钝,更难于原生质体化和再生。

2.4 原生质体形成和再生的显微观察

将 ZH-g 菌株及其原生质体采用悬滴法及染色法于 Olympus 显微镜下观察,形态如图 3 和图 4 所示。由图可见, ZH-g 菌株为细长型杆菌,运动,菌体连接成链,而其原生质体大部分已完全脱壁,呈球形,且往往相互堆积成团;取再生单菌落进行镜检,观察到其形态已恢复成杆状,重新生成细胞壁。



图 3 ZH-g 菌体形态
Fig. 3 The strain ZH-g



图 4 ZH-g 原生质体形态
Fig. 4 The protoplast of the strain ZH-g

3 结 论

影响原生质体形成与再生的因素很多。本文通过

研究酶浓度、酶的作用时间、菌龄、菌体预处理等因素对其的影响,总结出了果胶酶产生菌 ZH-g 原生质体制备和再生的最佳条件:在菌体生长的适当时期加入 $0.6 \mu\text{g/ml}$ 的氨基青霉素进行预处理,选用对数生长期的菌株,以 1.2mg/ml 溶菌酶 37 保温处理 2h,原生质体形成率达 92%,原生质体再生率可达 50.7%。此项工作为下一步的原生质体诱变育种创造了有利条件。

参考文献:

- [1] Sathyanarayana N G, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review[J]. Process Biochemistry, 2003, 38: 987-996.
- [2] Voragen F, Schols H, Visser R. Advances in pectin and pectinase research [M]. Kluwer Academic Publishers, 2003. 10-155.
- [3] Kashyap D R, Vohra P K, Chopra S, et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review[J]. Bioresource Technology, 2001, 77: 215-227.
- [4] Lilliana C, Jorge L. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice[J]. Food Chemistry, 1998, 61(1/2): 237-241.
- [5] 吴振昌. 微生物激光育种学的新进展[J]. 激光生物学报, 2004, 13(1): 3-7.
- [6] 郭爱莲, 朱宏莉. 紫外-氮激光复合诱变产果胶酶细菌的研究[J]. 光子学报, 2002, 31(11): 1335-1339.
- [7] 周东坡, 郭德栋, 平文祥, 等. 提高枯草杆菌原生质体再生率的进一步研究[J]. 微生物学杂志, 1985, 5(4): 51-54.
- [8] 周东坡, 平文祥. 微生物原生质体融合[M]. 哈尔滨: 黑龙江省科学技术出版社, 1990. 1-406.
- [9] 王卫卫, 任鹏康, 闫明, 等. He-Ne 激光对 -亚麻酸产生菌少根根霉的诱变作用[J]. 光子学报, 2002, 31(2): 157-161.
- [10] Chang S, Cohen S N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA[J]. Molec Genet Genet, 1979, 168(1): 111-115.
- [11] 郭德栋, 周东坡, 张丽琴, 等. 提高枯草杆菌原生质体再生率的研究[J]. 实验生物学报, 1984, 17(1): 119-124.
- [12] 周东坡, 平文祥, 贾树彪, 等. 原生质体融合选育赖氨酸高产菌种的研究[J]. 微生物学报, 1991, 31(4): 287-292.
- [13] 孙剑秋, 周东坡. 微生物原生质体技术[J]. 生物学通报, 2002, 37(7): 9-11.



1'ÄÜÊ³Æ¼¼ÊõÑD³¼;ÈµÃÄÁ»ÆÆ

由中国农科院农产品加工研究所与国家乳业工程技术研究中心和西南农业大学共同完成的“十五”国际科技合作计划项目“功能食品技术研究与产品开发”日前在北京通过了科技部组织的专家验收。

该项目建立了 - 葡聚糖的快速检测方法。此外,还研究明确了燕麦 - 葡聚糖可明显降低高血脂症大鼠的血脂水平,并能有效阻止高血脂症的形成。在此基础上,开发了具有降脂功能的燕麦新型功能食品。

在国内首次应用超临界 CO_2 分离纯化卵黄磷脂,并获得了较好的分离效果。确定了最佳萃取工艺参数,萃取率高达 96%,攻克了无重力双螺旋搅拌技术、微囊包裹技术等复合蛋黄卵磷脂加工关键技术,研制出两种剂型复合蛋黄卵磷脂制品和 1 种复合低胆固醇蛋黄蛋白粉,并建立了 1 条中试示范生产线。